

تعیین الگوی جذب پروتئین بر سطح نانوذره‌های زیست سازگار سوپر پارامغناطیس آهن اکسید با شکل و نسبت ابعادی متفاوت توسط الکتروفورز ژلی

فروغ قاسمی، محمدرضا هرمزی نژاد*⁺

دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

مرتضی محمودی

دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده: نانوذره‌های سوپر پارامغناطیس آهن اکسید به علت توانمندی‌های گسترده مانند جداسازی سلولی، گرمادرمانی و رهایش کنترل شده دارو به عنوان نانوذره‌های امیدبخش برای کاربردهای درمانی شناخته شده اند. وقتی نانوذره‌ها به محیط زیستی وارد می‌شوند، سطح آن‌ها با مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، مواد آلی طبیعی و آنزیم‌ها پوشیده می‌شود. بنابراین آن‌چه را که سلول‌ها، بافت‌ها و ارگان‌ها در برهمکنش با نانوذره‌ها می‌بینند نه سطح اولیه نانوذره بلکه کروماتیک سخت است. شکل نانوذره‌ها تأثیر مهمی بر میزان جذب پروتئین‌ها بر سطح آن‌ها و به دنبال آن برهمکنش با سلول‌ها دارد. در این پژوهش نانومیله‌های آهن اکسید با استفاده از روش رسوب‌گیری همگن یون‌های Fe^{2+} و Fe^{3+} و هیدرولیز آهسته‌آهسته در $90^{\circ}C$ سنتز شدند. در این واکنش اوره افزون بر این‌که به عنوان منبع یون هیدروکسید است، به عنوان یک قالب نرم برای تشکیل نانومیله‌ها عمل می‌کند. زیست‌سازگاری نانومیله‌های آهن اکسید بدون پوشش و با پوشش پلی اتیلن گلیکول با آزمایش *MTT-Assay* ارزیابی شد. نتیجه‌ها نشان داد که میزان زیست‌سازگاری نانوذره‌های پوشش‌دار بیش‌تر از بدون پوشش است. همچنین تأثیر شکل و نسبت ابعادی نانوذره‌های سنتز شده بر الگوی جذب پروتئین بر سطح آنها بررسی شد. سدیم دو دسیل سولفات ژل الکتروفورز تک بعدی (SDS-PAGE) برای جداسازی پروتئین‌های سرم جنین گاوی جذب شده بر سطح نانوذره‌ها و نشان دادن تأثیر شکل و نسبت ابعادی نانوذره‌ها بر الگوی جذب مورد استفاده قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: نانوذره‌های سوپر پارامغناطیس آهن اکسید؛ پروتئین کرونا؛ زیست‌سازگاری؛ نسبت ابعادی؛ جذب پروتئین.

KEYWORDS: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles; Protein corona; Biocompatibility; Aspect ratio; Protein absorption.

+E-mail: hormozi@sharif.edu

*عهده دار مکاتبات

مقدمه

دانش نانو به مطالعه اجسام و سامانه‌هایی که حداقل یک بعد آن‌ها بین ۱-۱۰۰ نانومتر است، می‌پردازد. یکی از پرکاربردترین نانومواد، نانوذره‌های مغناطیسی هستند که در این پژوهش از آن‌ها استفاده شده است. نانو ذره‌های مغناطیسی از موادی مانند آهن، کبالت، نیکل و آلیاژهای آن‌ها ساخته شده‌اند. این مواد به دلیل ویژگی‌های مغناطیسی یگانه، بسیار مورد توجه هستند [۱]. در میان ترکیب‌های مغناطیسی گوناگون، اکسیدهای آهن به دلیل پایداری شیمیایی، تطبیق‌پذیری زیستی و فرایند تولید به نسبت ساده، بیش‌ترین توجه را به خود جلب کرده‌اند. در حال حاضر نانو ذره‌های مغناطیسی به طور فزاینده‌ای در رهایش هدفمند دارو، تصویربرداری مغناطیسی هسته، ترمیم بافت‌ها و گرمادرمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲]. روش‌های ساخت نانوذره‌ها به دو دسته فیزیکی و شیمیایی تقسیم می‌شود. از روش‌های فیزیکی می‌توان به تبخیر با استفاده از قوس الکتریکی، تبخیر گرمایی، تبخیر لیزری و تبخیر با پلاسما اشاره کرد. از روش‌های شیمیایی نیز می‌توان به روش سل - ژل، هم رسوبی، روش‌های احتراقی، میکرومولسیون و آب - گرمایی اشاره کرد [۱]. هم رسوبی یک روش ساده برای تهیه اکسیدهای آهن از محلول یون‌های Fe^{2+} و Fe^{3+} است. واکنش در جو خنثی و در دمای اتاق یا بالاتر انجام می‌شود. اندازه، شکل و ترکیب نانو ذره‌های مغناطیسی به دست آمده به نسبت مولی Fe^{2+} و Fe^{3+} ، دمای واکنش، pH و قدرت یونی محیط وابسته است. بازده این روش بالا، اما توزیع اندازه ذره‌های گسترده است. این توزیع گسترده منجر به رفتار مغناطیسی غیر ایده آل در بسیاری از کاربردها می‌شود [۳].

نانوذره‌ها به دلیل نسبت سطح به حجم بالای خود، دارای سطح فعال از نظر شیمیایی هستند. به این دلیل در کاربردهای زیستی، نانوذره‌ها برای کاهش انرژی سطح خود تمایل به برهمکنش با اجزای موجود در محیط دارند. بنابراین در یک محیط زیستی سطح نانوذره‌ها با لایه‌ای پیچیده از مولکول‌های زیستی پوشیده می‌شود. به پروتئین‌هایی که سطح نانوذره را پوشش می‌دهند، پروتئین کرونا می‌گویند. ماهیت و یا ساختار پروتئین ممکن است پس از اتصال به سطح نانوذره‌ها تغییر کند و در نتیجه در وظیفه‌های آن پروتئین خاص اختلال ایجاد شود. به لایه پروتئینی درونی که سرعت مبادله خیلی کمی با محیط دارد، کرومای سخت و به لایه پروتئینی خارجی که سرعت مبادله بالایی با پروتئین‌های آزاد در محیط دارد؛ کرومای نرم گفته می‌شود. شناسایی پروتئین‌های جذب شده و

طول عمر آن‌ها بر سطح نانوذره‌ها برای طراحی فراورده‌های نانو بی خطر مهم است [۴].

در کنار کاربردهای فراوان نانوذرات، مسئله بی خطر بودن و امنیت استفاده از آن‌ها نیز مطرح است. به علت اندازه کوچک نانوذره‌های، آن‌ها می‌توانند از طریق بو کردن، بلع و نفوذ به پوست به بدن انسان وارد شوند. آن‌ها با ساختارهای درون سلولی و درشت مولکول‌ها برای یک دوره زمانی طولانی برهمکنش می‌کنند [۵]. از این رو لازم است پیش از استفاده از نانوذره‌های زیست سازگاری آن‌ها بررسی شود. در این پژوهش نخست نانوذره‌های آهن اکسید با یک روش نوین سنتز شدند. در این روش از اوره به‌عنوان منبع تولید یون هیدروکسید استفاده شد. تولید آهسته و یکنواخت هیدروکسید در سراسر محلول منجر به تولید ذره‌های هم اندازه خواهد شد. در مرحله بعد میزان سمیت ذره‌های فراوری شده با آزمون MTT (۳-۴.۵-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۲،۵-دی فیل تترازولیوم برومید تعیین شد. سرانجام الگوی جذب پروتئین‌های جنینی بر سطح این نانوذره‌ها با فناوری ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

بخش تجربی

تهیه مواد و وسایل مورد نیاز

ترکیب‌هایی چون آهن (II) کلرید چهار آبه، آهن (III) کلرید شش آبه، اوره، پلی اتیلن گلیکول، استیک اسید، سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، سدیم کربنات، نقره نترات، اتانول، بتا مرکاپتو اتانول، برومو فنول بلو ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)، کوماسی بریلیات بلو ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$) از شرکت مرک و ترکیباتی چون محیط کشت سلولی (RPMI)، مونومر اکریل آمید، مونومر بیس اکریل آمید، آمونوم پرسولفات، سدیم هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات تک آبه از شرکت سیگما آلدیج خریداری شدند. سدیم کلرید، پتاسیم کلرید و متانول از شرکت پانراک، سرم جنینی گاوی (FBS) از شرکت ژیبکو، تریپسین از شرکت سرومد و معرف رنگی تریپان بلو از شرکت فلوکا خریداری شدند. فلاسک کشت سلولی و پلیت ۹۶ چاهکی از شرکت نانک تهیه شدند. سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی (AGO-1522)، از نوع سلول‌های چسبنده از بانک سلولی ایران تهیه شدند.

روش تهیه نانوذره‌های اکسید آهن

برای سنتز نانوذره‌های اکسید آهن راکتوری طراحی و ساخته شد. این راکتور شامل ورودی و خروجی گاز، ورودی مواد اولیه و اتصال

محلول MTT کشیده شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول افزوده شد و پلیت به مدت ۲۰ دقیقه درون انکوباتور قرار داده شد تا رسوب‌های تشکیل شده در الکل حل شوند. سپس میزان جذب خوانده شد و از روی مقادیرهای به دست آمده نمودار مربوط به زیست پذیری سلول‌ها رسم شد.

ژل الکتروفورز

برای بررسی پروتئین‌های جذب شده بر سطح نانوذره‌ها از روش SDS-PAGE استفاده شد. محلول ۱/۰ mg/mL از نانوذره‌ها در دمای ۳۷ °C در مجاورت FBS قرار داده شد. به منظور حذف کروماتین از سه مرتبه سانتریفیوژ استفاده شد. سپس پروتئین‌ها به همراه بافر نمونه به مدت ۴ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. تزیق شدند. ولتاژ بر روی ۲۰۰ ولت تنظیم شد. با رسیدن پروتئین‌ها به انتهای ژل، با قطع ولتاژ واکنش متوقف شد. برای آشکارسازی خطوط پروتئینی از روش رنگ آمیزی نقره استفاده شد.

دستگاه‌ها

مشخصه یابی نانوذره‌ها در این پژوهش با استفاده از دستگاه‌های طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرسرخ (FT-IR، ABB Bomen، MB100، کشور سازنده کانادا)، میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM، S4160HITACHI کشور سازنده ژاپن)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM، مدل PHILIPS MC10TH 100KV)، پراش اشعه ایکس (XRD، λ K α radiation, CuD8=A°1.5406)، پتانسیل زتا و پراکن گنی دینامیکی نور (DLS^(۱)) (Viscotec 802) و مغناطیس‌سنج با نمونه نوسانی (VSM، Riken BHV-55، ژاپن) انجام شد. اندازه گیری‌های جذبی با استفاده از قرائت گر میکرو پلیت^(۲) (مدل Stat Fax-2100، کشور سازنده آمریکا) و اندازه گیری‌های وزنی با استفاده از ترازوی (KERN & Sohn GmbH، آلمان) انجام شد. همچنین از گرم‌کن - همزن Wisestire، مدل MSH-20D استفاده شد. جداسازی پروتئین‌ها با استفاده از کیت ژل الکتروفورز (شرکت بیورد، سوئیس) انجام شد. شستشوی نانوذره‌های مغناطیسی سنتز شده با استفاده از ستون MACS^(۳) (Miltenyi Biotec، آلمان) انجام شد.

به مبرد است. مقدار ۲۳/۰ گرم اوره و ۴۰/۰ میلی لیتر آب یون‌زدایی شده در ظرف اصلی ریخته شد. به این ظرف رابط گاز را وصل نموده و به مدت ۴۵ دقیقه همراه با هم‌زدن، گاز آرگون در محلول دمیده شد. ۰/۳۶۵ گرم نمک آهن(II) کلرید و ۱/۰ گرم نمک آهن(III) کلرید در ۱۰ میلی لیتر محلول هیدروکلریک اسید ۱/۰ مولار حل شدند. بعد از ۴۵ دقیقه محلول نمک‌ها به محلول اوره افزوده شد. به مدت ۱۰ دقیقه همراه با هم‌زدن، گاز آرگون در محلول دمیده شد. دور هم‌زن ۱۳۰۰ دور بر دقیقه و دمای حمام روغن در ۹۰ °C تنظیم شد. شایان ذکر است که همه مرحله‌های سنتز ذره‌ها در حضور گاز آرگون انجام شد. پس از ۸ ساعت از انجام واکنش رسوب بدست آمده در ارلن ریخته شد و سه مرتبه توسط ۲۵ میلی لیتر نیتریک اسید ۰/۰۱ مولار و به کمک آهن‌ربا شسته شد. محلول نهایی در یخچال، در دمای ۶ °C برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

روش تهیه نانوذره‌های اکسید آهن با پوشش پلی اتیلن گلیکول

تهیه نانوذره‌های پوشش‌دار مطابق با روش سنتز نانوذره‌های بدون پوشش است. با این تفاوت که مقدار ۳/۶۴ میلی لیتر پلی اتیلن گلیکول به محلول اولیه افزوده شد.

بررسی زیست سازگاری

برای کمی سازی میزان سلول‌های فعال از نظر سوخت و ساز از آزمون MTT استفاده شد. برای ارزیابی MTT، از پلیت ۹۶ چاهکی استفاده شد. تعداد سلول در هر چاهک ۱۰۰۰۰ در نظر گرفته شد. بعد از ریختن سلول‌ها، پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت به کمک سمپلر خارج شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه بر روی سلول‌ها ریخته شد. در هر ستون از نانوذره‌های با غلظت X تا X/۸ ریخته شد. درب پلیت گذاشته شد و به مدتی که لازم است (در این پژوهش ۴، ۶ و ۲۴ ساعت) سلول‌ها در معرض نانوذره‌ها قرار گرفتند. پس از این مدت محیط کشت با سمپلر خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT ۵ mg/mL بر روی سلول‌ها ریخته شد. ۲ ساعت زمان داده شد تا محلول MTT بر روی میتوکندری سلول‌های زنده اثر بگذارد و رسوب ترکیب ارغوانی رنگ فورمازان تشکیل شود. پس از این مدت با کمک سمپلر

(۱) Dynamic light scattering

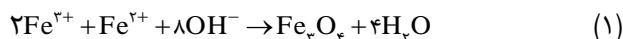
(۲) Microplate reader

(۳) Magnetic-activated cell sorting

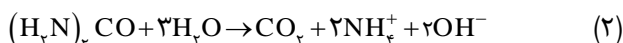
نتیجه ها و بحث

سنتز نانوذره‌های آهن اکسید

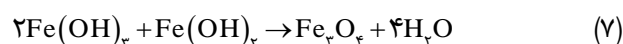
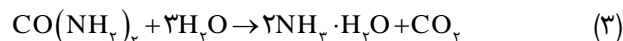
در این پژوهش از روش هم رسوبی همگن برای سنتز نانوذره‌های مغناطیسی آهن اکسید استفاده شد. در این روش نانوذره‌های آهن اکسید مطابق با واکنش نشان داده شده در معادله (۱) تهیه می‌شوند.



یکی از هدف‌های این پژوهش سنتز نانوذره‌های مغناطیسی آهن اکسید پایدار و با توزیع اندازه محدود است. یکی از روش‌های تولید ذره‌ها با اندازه محدود رسوب‌گیری همگن است. در این روش عامل رسوب دهنده در محلول آنالیت توسط واکنش شیمیایی کندی تولید می‌شود. اوره بیش‌تر برای تولید همگن یون هیدروکسید به کار می‌رود. این واکنش که در معادله (۲) دیده می‌شود، در بازه دمایی °C ۹۰-۱۰۰ به کندی انجام می‌شود [۶].



بنابراین مطابق با روابط زیر از محیط قلیایی ایجاد شده توسط اوره برای سنتز نانو ذره‌های آهن اکسید استفاده می‌شود [۷].

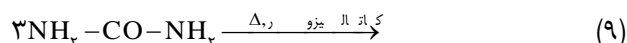
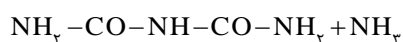


آزمایش‌های بسیاری برای تولید ذره‌های پایدار انجام شد. در این آزمایش‌ها غلظت نمک‌های آهن، اوره، هیدروکلریک اسید و دمای واکنش برای تولید محلول پایدار بهینه شدند. مقدارهای نمک‌های آهن طوری تنظیم شدند که نسبت مولی یون‌های Fe^{3+} به Fe^{2+} ، ۲ به ۱ باشد. از هیدروکلریک اسید به منظور جلوگیری از اکسایش آهن (II) استفاده می‌شود. با توجه به این موارد آزمایشی با مقدارهای ابتدایی از اوره، نمک‌های آهن و هیدروکلریک اسید انجام شد و در ادامه با توجه به مشاهده‌ها، این مقادیر تغییر داده شدند. نخست ۲۷۰ گرم اوره در ۷۵ میلی لیتر آب بدون یون حل شد و مقدار ۲۰ میلی لیتر هیدروکلریک اسید ۲ مولار به محلول اوره اضافه شد. ۰/۴۴۷ گرم نمک آهن (II) کلرید و ۱/۲۱۵ گرم نمک آهن (III) کلرید (نسبت مولی ۲ به ۱) به محلول

آزمایش افزوده شد. این آزمایش در دمای °C ۱۱۰ در مدت ۶ ساعت کامل شد. بعد از شستشو توسط نیتریک اسید ۰/۰۱ مولار نانوذره‌ها ته نشین شدند و محلول کلئیدی به دست نیامد. به دلیل این که زمان طولانی واکنش می‌تواند موجب بزرگ شدن اندازه نانوذره‌ها و در نتیجه ته نشینی آن‌ها شود، در آزمایش‌های بعدی مقدار هیدروکلریک اسید ۲ مولار از ۲۰ میلی لیتر تا ۰ میلی لیتر کاهش داده شد. در این آزمایش‌ها بعد از شستشو نانوذره‌ها پایدار نبوده و در مدت زمان بسیار کم ته نشین شدند. اوره می‌تواند با پیوند های هیدروژنی به سطح نانوذره‌ها متصل شود [۸]. بنابراین تصور بر این بود که اوره اضافی می‌تواند موجب اتصال نانوذره‌ها به یکدیگر و در نتیجه ته نشین شدن آن‌ها شود. در آزمایش‌های بعدی مقدار اوره تا ۳/۵۰ گرم کاهش داده شد. در این آزمایش‌ها نیز محلول کلئیدی پایدار به دست نیامد. دمای بالای واکنش عاملی برای تجمع ذره‌ها است. بنابراین دما تا °C ۹۰ کاهش داده شد و همه آزمایش‌های بعدی در این دما انجام شدند. هر چه حجم کلی محلول واکنش کمتر باشد، در واقع محلول همگن‌تری داریم. بنابراین تمامی مقدارها طوری تنظیم شدند (طبق نتیجه‌هایی که از آزمایش‌های پیشین به دست آمد) که حجم کل واکنش ۵۰ میلی لیتر باشد. سرانجام با استفاده از ۲۳/۰ گرم اوره، ۱/۰۰ گرم نمک آهن (III) کلرید، ۰/۳۶۵ گرم نمک آهن (II) کلرید و ۱۰ میلی لیتر هیدروکلریک اسید ۱ مولار، پس از شستشو محلول کلئیدی پایدار به دست آمد. تغییرهای رنگ محلول واکنش با گذشت زمان در شکل ۱ دیده می‌شود. به دلیل ناپایداری محلول مربوط به زمان ۲۰ ساعت، واکنش در زمان ۸ ساعت متوقف شد.

به منظور اطمینان از حذف کامل ناخالصی‌ها و مواد واکنش نکرده پس از شستشو توسط آهنربا، از ستون MACS استفاده شد. پس از ورود محلول به این ستون، همه ذره‌های مغناطیسی تحت تأثیر میدان مغناطیسی قوی موجود، در ستون باقی می‌مانند. همان‌گونه که در شکل ۲ قسمت a دیده می‌شود، مواد غیر مغناطیسی از ستون خارج می‌شوند. پس از چندین بار شستشو توسط نیتریک اسید ۰/۰۱ مولار نانوذره‌ها با جدا کردن ستون از میدان مغناطیسی، از ستون خارج شدند. برای نشان دادن حذف کامل ناخالصی‌ها این نانوذره‌ها به ستون دیگری وارد شدند. رنگ محلول خروجی در شکل ۲ قسمت b نشان دهنده کارایی ستون در حذف ناخالص‌های غیر مغناطیسی است. این نتیجه‌ها نشان می‌دهند که شستشو با قرار دادن مستقیم نانوذره‌ها بر روی آهنربا کافی نیست.

در صورتی که هیدروکلریک اسید استفاده شده به عنوان کاتالیست عمل کند، ممکن است افزون بر بی اورت، تری اورت هم در زمان گرما دادن محلول اوره تولید شود. واکنش های تراکم اوره سبب اتصال مولکول های اوره و در نتیجه ژله ای شدن محلول پس از گرما دادن می شوند.



تغییر pH محلول واکنش در شکل ۳ دیده می شود. تا زمان ۲ ساعت از شروع واکنش pH به کندی افزایش می یابد و پس از آن تا زمان ۴ ساعت به تقریب ثابت می ماند. تا زمان ۵ ساعت pH افزایش می یابد و پس از آن به تقریب ثابت است.

همچنین در این پژوهش نانوذره های اکسید آهن با پوشش پلی اتیلن گلیکول سنتز شدند. بایستی توجه شود که برای افزودن هر چه بیش تر تأثیر عامل پوشش دهنده در کنترل اندازه ذره ها، پلی اتیلن گلیکول به صورت درجا و در همان مرحله تولید نانوذره ها افزوده شد. مزیت حضور عامل پوشش دهنده از شروع واکنش، کاهش نرخ رشد و جلوگیری از رشد بیش از حد و تجمع نانوذره ها تولید شده، همچنین ایجاد دافعه فضایی لازم برای تأمین پایداری مناسب است [۱۰].

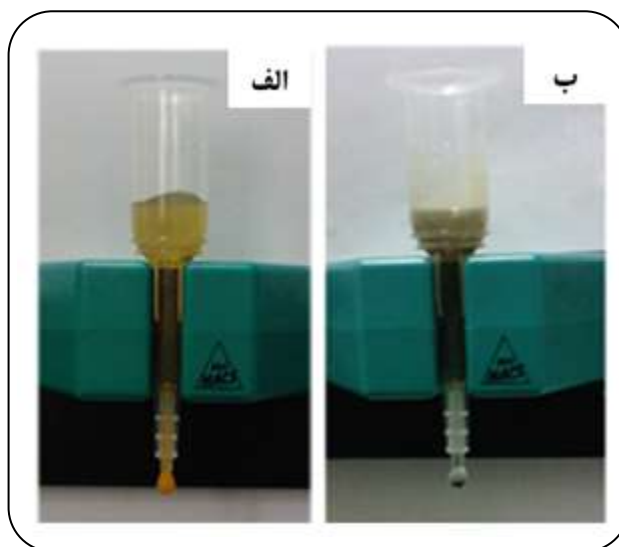
آنالیز XRD برای بررسی میزان خلوص از دید تشکیل ساختارهای جانبی، ساختار بلوری نانوذره های فراوری شده مورد استفاده قرار گرفت. در یک طرح پراش، به کمک میزان شدت به دست آمده از پیک های نمونه مورد آزمون و مقایسه آن با شدت پیک های مرجع، می توان اندازه بلورها را توسط پهنای خط های XRD و با استفاده از رابطه شرر^(۳) (معادله (۱۰)) محاسبه کرد.

$$L = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (10)$$

در این رابطه θ زاویه براگ پیک مورد نظر، λ طول موج پرتو ایکس مورد استفاده، L اندازه متوسط کریستالیست ها (که در این جا به دلیل تک دانه بودن هر ذره، اندازه کریستالیست به دست آمده با اندازه ذره برابر در نظر گرفته می شود)، K ثابت شرر (۰/۹) و β عرض پیک در نصف ارتفاع آن که بر حسب رادیان است.



شکل ۱ - تغییرهای رنگ محلول واکنش با گذشت زمان (الف) ۲ (ب) ۴ (ج) ۵ (د) ۶ (ه) ۸ (ی) ۲۰ ساعت از آغاز واکنش



شکل ۲- خروج (الف) مواد غیر مغناطیسی (ب) محلول شستشو از ستون MACS

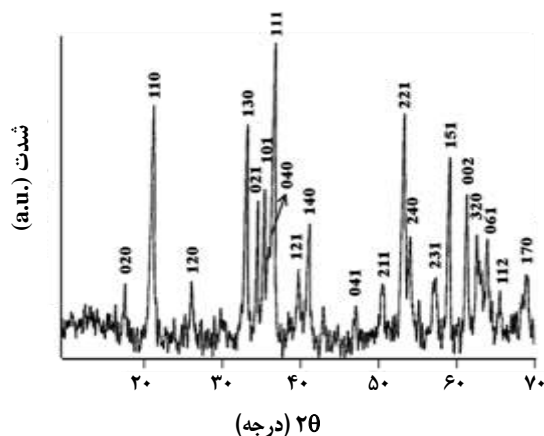
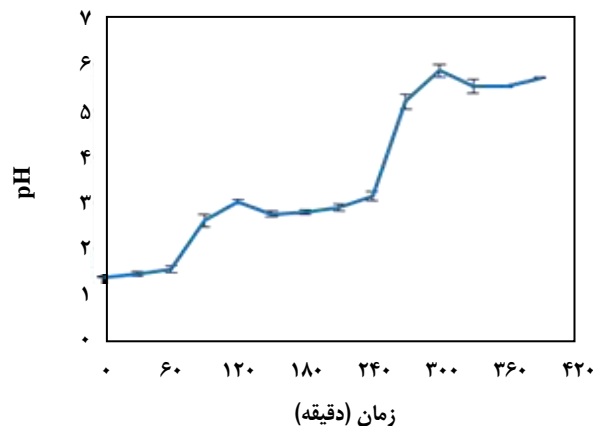
با توجه به گران بودن ستون های MACS شستشوی مقادیر زیادی از نانوذره ها توسط آن ها به صرفه نیست. بنابراین برای شستشو، محلول مغناطیسی به صورت عمودی در کنار آهن ربا قرار داده شد. این عمل موجب ته نشین شدن مواد غیر مغناطیسی در ته ظرف می شود و نانوذره های مغناطیسی به دیواره ظرف می چسبند. بنابراین نانوذره های مغناطیسی به سادگی از مواد غیر مغناطیسی جدا می شوند.

گرم کردن محلول اوره سبب واکنش تراکم اوره و تشکیل بی اورت^(۱) می شود (معادله (۸)). همچنین در حضور کاتالیست مناسب با تراکم سه مولکول اوره تری اورت^(۲) تشکیل می شود (معادله (۹)) [۹].

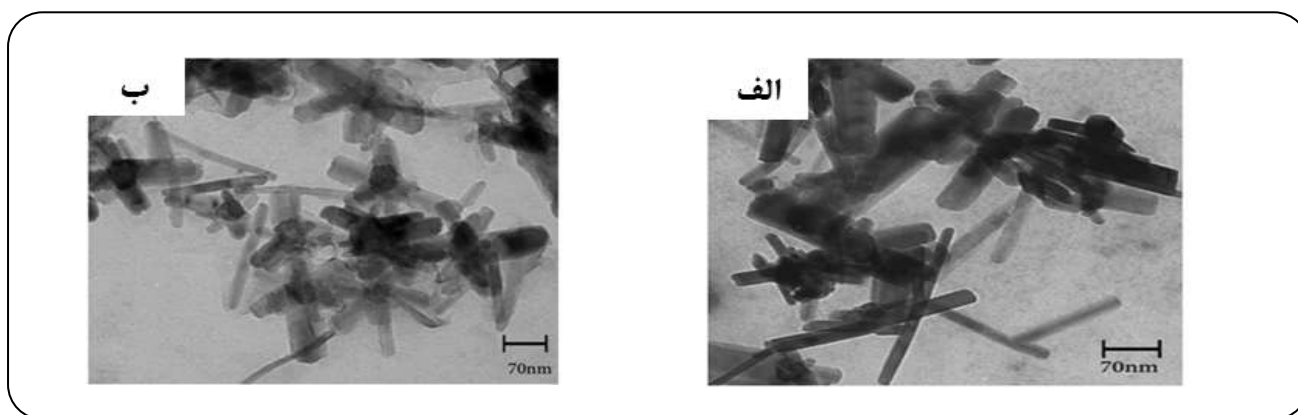
(۱) Biuret

(۲) Triuret

(۳) Scherrer

شکل ۴- طیف XRD مربوط به نمونه α -FeOOH.

شکل ۳- روند تغییرهای pH در زمان واکنش.

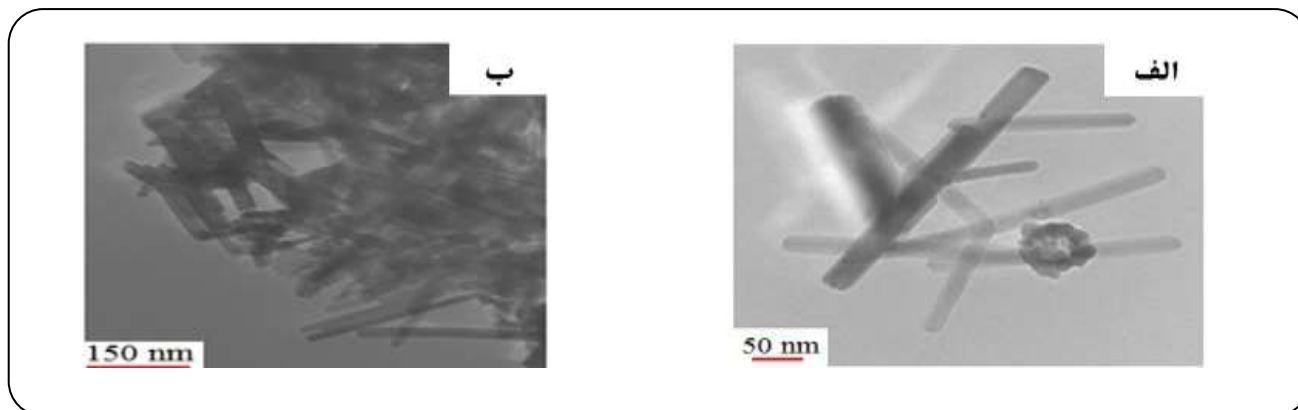
شکل ۵ - تصویرهای مربوط به نمونه های (الف) α -FeOOH و (ب) α -FeOOH-PEG.

طیف FTIR مربوط به اوره استفاده شده در سنتز نانوذره‌ها در شکل ۷ قسمت a دیده می‌شود. پیک مربوط به گروه کربونیل اوره در حدود 1670 cm^{-1} ظاهر شده است. در طیف α -FeOOH پیک گروه کربونیل در 1730 cm^{-1} (شکل ۷ قسمت b) دیده می‌شود. این پیک مربوط به گروه کربونیل استری است. احتمال داده می‌شود که جابجایی پیک کربونیل به علت واکنش اوره با سطح نانوذره‌ها است.

به منظور مشخص کردن مکانیسم تشکیل نانومیله‌ها در زمان‌های گوناگون از شروع واکنش، با سرد کردن نمونه واکنش متوقف شد. تصویرهای SEM نانوذره‌های به دست آمده در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت از شروع واکنش در شکل ۸ دیده می‌شوند. به دلیل این که مقدار نانوذره‌های مغناطیسی ایجاد شده در زمان ۲ ساعت خیلی کم است و توسط آهنربا قابل جداسازی نیستند، برای جدا کردن این نانوذره‌ها از ستون MACS استفاده شد.

نمودار XRD مربوط به نمونه α -FeOOH در شکل ۴ دیده می‌شود. در نمودار XRD این نانوذره‌ها مطابق شکل ۴ و بر اساس مرجع α -FeOOH (JCPDS) ۰۷۱۳-۲۹ پیک‌های مشخصه مربوط به α -FeOOH به خوبی مشخص هستند. در واقع نانومیله‌های سنتز شده α -FeOOH هستند. در مورد نانوذره‌های پوشش‌دار شده با پلی اتیلن گلیکول طیف همانندی دیده شد.

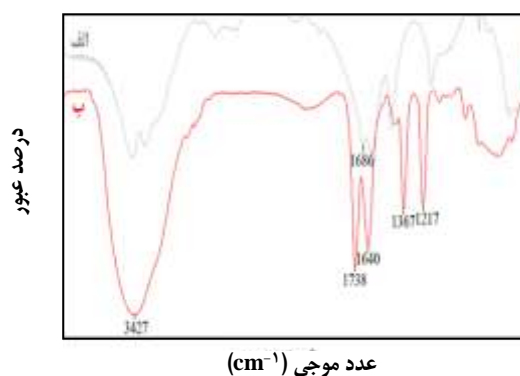
تصویرهای TEM مربوط به نانوذره‌های α -FeOOH و α -FeOOH-PEG در شکل ۵ و به ترتیب در قسمت‌های a و b دیده می‌شوند. این تصویرها نشان دهنده سنتز نانومیله‌های مغناطیسی هستند. تصویرهای TEM در شکل ۶ مربوط به شش ماه پس از سنتز نانوذره‌ها هستند. در این مدت محلول مغناطیسی چندین بار تحت تأثیر امواج فراصوت قرار گرفت. این تصویرها نشان دهنده پایداری نانومیله‌ها و تخریب نشدن در حضور این امواج است. طول متوسط نانومیله‌ها ۱۵۵ نانومتر و نسبت ابعادی متوسط آن‌ها ۱۰ است.



شکل ۶ - تصویرهای TEM نانوذره‌های α -FeOOH بعد از شش ماه از سنتز.

قطر هیدرودینامیکی ذره‌ها به وسیله آزمون DLS اندازه گیری شد. اندازه ذره‌های به دست آمده در این آزمون (شکل ۱۰) بالاتر از میزانی بود که از تصویرهای TEM و SEM به دست آمد. گیری^(۱) و همکاران بر این عقیده اند که بین ذره‌های مغناطیسی یک برهمکنش دوقطبی - دوقطبی وجود دارد [۱۱]. در نتیجه اتصال نانوذره‌های قطر کروی هم ارز اندازه گرفته شده به کمک آزمون DLS بزرگ‌تر از قطر هیدرودینامیکی واقعی نانوذره‌های به دست آمده از سایر روش‌ها است. پتانسیل زتا مربوط به پتانسیل موجود در فاصله هیدرودینامیکی^(۲)، فاصله بین لایه درونی و بیرونی اطراف ذره، است که افزون بر تعیین بار سطحی ذره، به عنوان یک پارامتر مناسب برای نشان دادن ثبات بالقوه سیستم کلوتیدی به شمار می رود. نتیجه‌های مربوط به اندازه گیری پتانسیل زتا بیانگر بار سطحی مثبت مربوط به نانو میله‌های مورد نظر بود که تأییدی بر اتصال اوره بر سطح نانومیله‌ها است.

برای اندازه گیری رفتار مغناطیسی نانوذره‌های سنتز شده از آزمون VSM استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۱۱ دیده می‌شود مقدار مغناطش اشباع مربوط به نمونه α -FeOOH برابر ۲۶ emu/g و برای نمونه α -FeOOH-PEG برابر ۱۸ emu/g است. این مقادارها از مغناطش اشباع نمونه بالک (۹۲ emu/g) کمتر است [۱۲]. در منابع گوناگون مقدار مغناطش اشباع برای مگنتیت با توجه به عامل‌هایی مانند روش تولید و در نتیجه توزیع اندازه ذرات، نوع و میزان پوشش، شکل و درصد خلوص نانوذره‌های متفاوت گزارش شده است. نیروی پسمان زدای مغناطیسی در نمونه‌های α -FeOOH و α -FeOOH-PEG به ترتیب برابر ۱۵۳ Oe و ۱۰۴ Oe هستند. نمونه‌های فراوری شده رفتاری نزدیک سوپرپارامغناطیس از خود

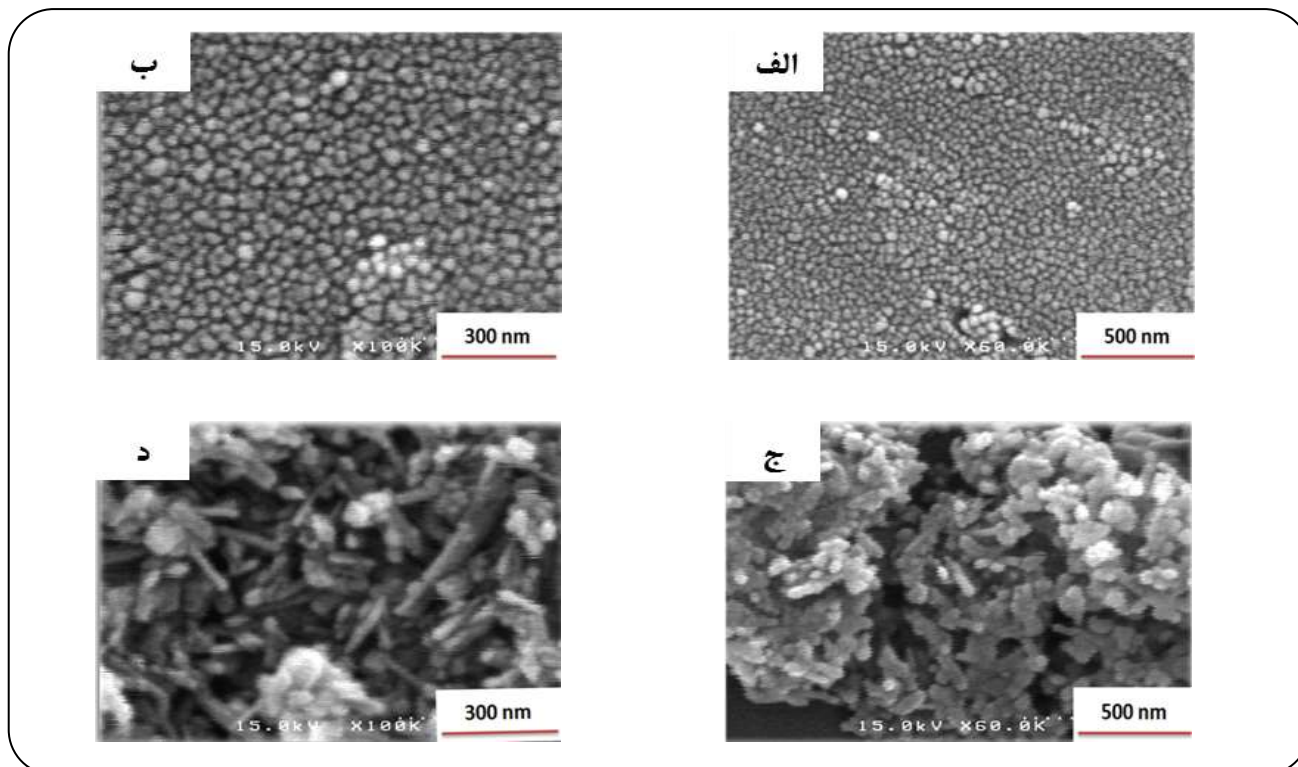


شکل ۷- طیف FTIR (الف) اوره خالص (ب) نانومیله‌های سنتز شده.

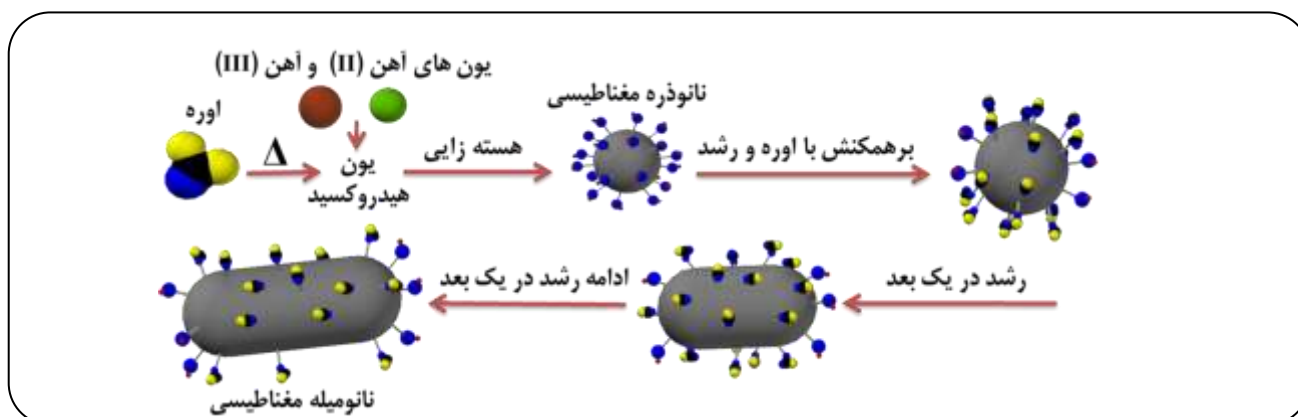
اوره در واکنش تشکیل نانوذره‌های اکسید آهن دارای نقش دوگانه است. در طی روند سنتز، هیدرولیز اوره منجر به تولید آهسته یون هیدروکسید می شود. بعد از تولید مقادارهای کافی از یون هیدروکسید هسته‌های اولیه نانوذره‌ها تشکیل می‌شوند. همان‌گونه که در تصویرهای SEM قسمت a دیده می‌شود، این هسته‌های اولیه به تقریب کروی هستند. با گذشت زمان این هسته‌ها رشد می‌کنند (شکل ۸ قسمت b). این هسته‌های اولیه به عنوان مکان‌هایی برای رشد نانومیله‌ها عمل می‌کنند. جابه‌جایی پیک کربونیل مربوط به اوره در طیف FT-IR نمونه‌ها همان‌گونه که در پیش بیان شد دلیلی بر واکنش اوره با سطح نانوذره‌ها است. وجود اوره بر سطح نانوذره‌ها منجر به رشد هسته‌ها در یک جهت می‌شود. تصویرهای SEM تأیید کننده مکانیسم پیشنهادی هستند. روند رشد تشکیل نانومیله‌های اکسید آهن در شکل ۹ به صورت شمایی دیده می‌شود.

(۱) Giri

(۲) Hydrodynamic shear



شکل ۸ - تصویرهای FE-SEM بعد از زمان (الف) ۲ (ب) ۴ (ج) ۶ (د) ۸ ساعت از شروع واکنش.



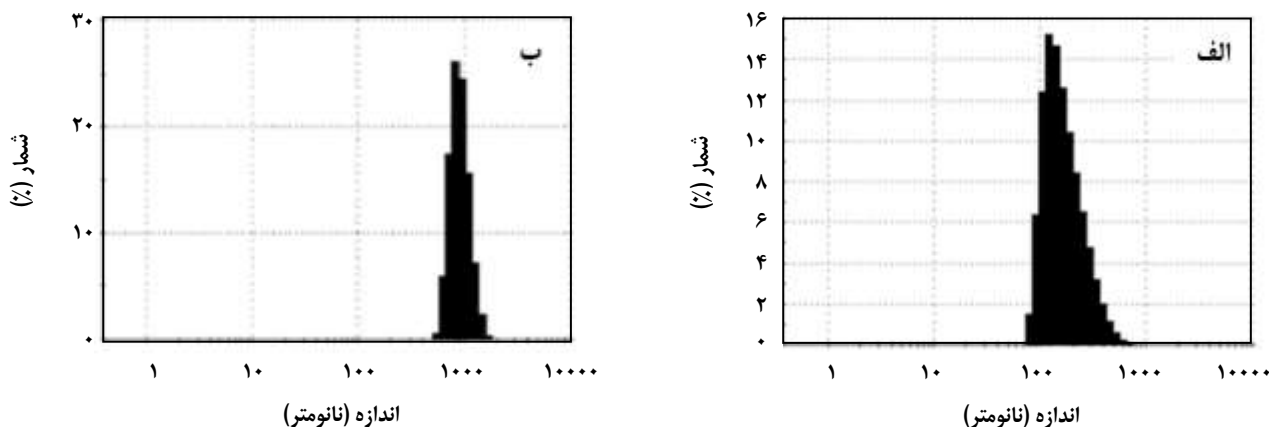
شکل ۹- طرح شمایی روند رشد نانو میله های آهن اکسید.

لازم است داشته باشد، باید زیست سازگار نیز باشد. زیست سازگاری محلول های مغناطیسی در پژوهش حاضر با آزمون MTT بررسی شدند. نتیجه های کلیه آزمون های MTT با شش بار تکرار گزارش شد. نتیجه های این آزمون در مدت زمان های ۴، ۶ و ۲۴ ساعت و برای غلظت های X ، $X/2$ ، $X/4$ و $X/8$ از آهن بر حسب میزان زیست پذیری گزارش شده است (مقدار X برای نانوذره های بدون پوشش برابر با 12.5 mg/L است). سلول های مورد استفاده AGO

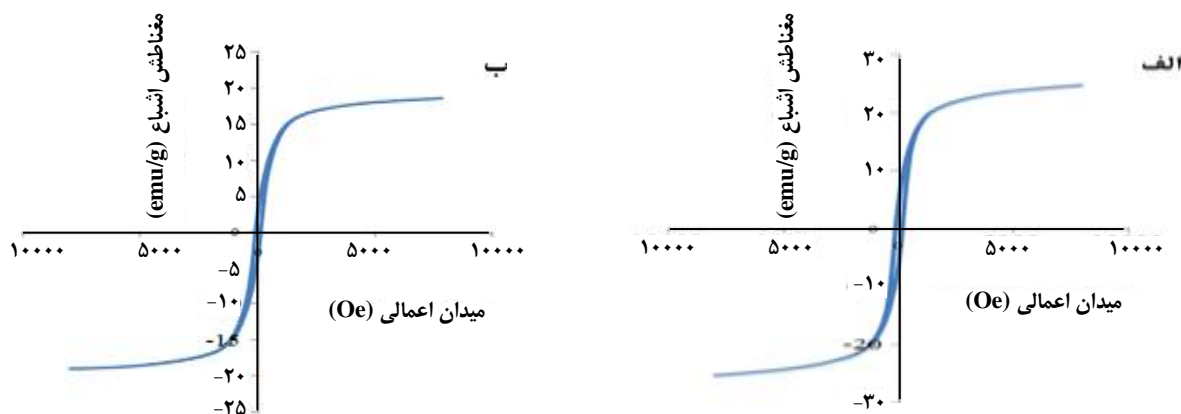
نشان می دهند. ولی نیروی پسماند مغناطیسی به طور کامل حذف نشده است که می تواند به علت بزرگتر بودن اندازه برخی از نانومیله ها از اندازه ذره تک حوزه و همچنین وجود اوره بر سطح نمونه باشد.

آزمون های زیست سازگاری

به طور کلی هر ماده ای که برای کاربردهای زیستی فراوری می شود در کنار تمام ویژگی هایی که برای کاربرد مورد نظر



شکل ۱۰- توزیع اندازه نانومیله های (الف) α -FeOOH (ب) α -FeOOH-PEG بر حسب درصد فراوانی آن‌ها.



شکل ۱۱- نمودار مغناطش اشباع نانوذرات (الف) α -FeOOH (ب) α -FeOOH-PEG بر حسب میدان مغناطیسی اعمالی.

کمتری که دارد، آسیب DNA کمتری را سبب می‌شود [۱۳]. روند زیست سازگاری توضیح داده شده برای زمان مجاور سازی ۴ ساعت، در مورد زمان های مجاورسازی ۸ و ۲۴ ساعت نیز دیده شد.

جذب پروتئین بر سطح نانوذره‌های آهن اکسید

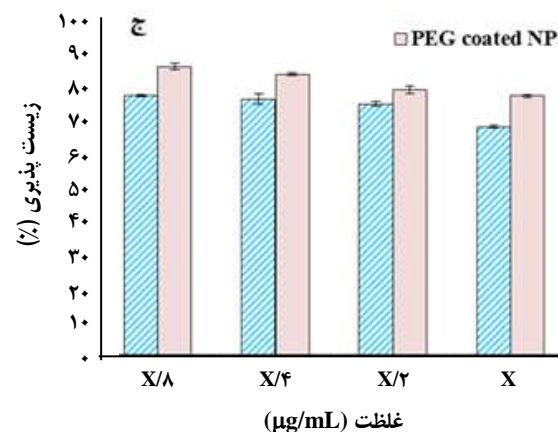
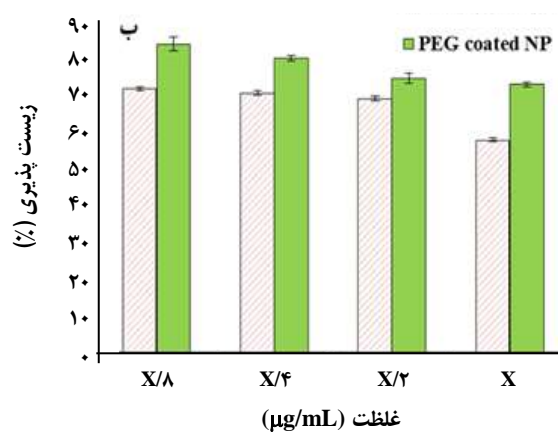
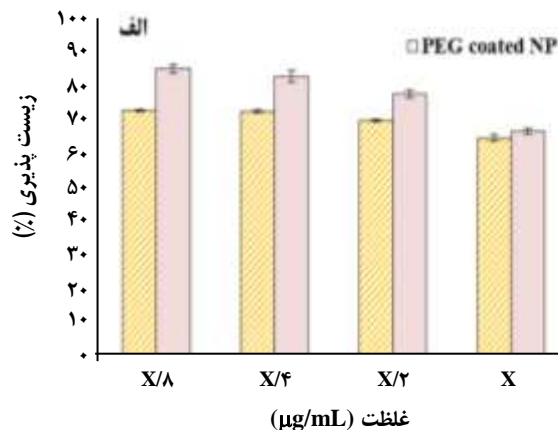
الگوی جذب پروتئین بر سطح نانوذره‌ها توسط فناوری ژل الکتروفورز بررسی شد. برای بررسی اثر نسبت ابعادی نانوذره‌ها بر الگوی جذب آن‌ها، از نانوذره‌های سنتز شده در زمان‌های گوناگون رشد استفاده شد. همان‌گونه که در تصاویرهای SEM شکل ۸ دیده شد، نانوذره‌های به‌دست آمده در زمان چهار ساعت کروی بودند. بنابراین از این نانوذره‌ها به عنوان نمونه کروی برای مقایسه با نانوذره‌های میله‌ای استفاده شد. همچنین نمونه شش ساعت

از تیره فیروبولاست پوست انسانی بودند. هر چه میزان زیست پذیری نانوذره‌ها بیشتر باشد، تعداد سلول‌های زنده بیشتر بوده و در نتیجه غلظت فرمازان و شدت رنگ مربوط به آن بیشتر خواهد بود. همان‌گونه که در شکل ۱۲ دیده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذره‌ها میزان زیست پذیری آن‌ها کاهش می‌یابد. میزان زیست‌پذیری نانوذره‌های پوشش دار با پلی اتیلن گلیکول (با وجود دو برابر بودن غلظت آن‌ها) در تمامی غلظت‌های نانوذره‌ها بیشتر از زیست پذیری نانوذره‌های بدون پوشش است. دیده شده است که استفاده از نانوذره‌های بدون پوشش آهن اکسید، با اثرهای سمی چشمگیری همانند التهاب، تشکیل سلول‌های مرده، عملکرد میتوکندریایی معیوب، تراوش غشایی لاکتات دهیدروژناز، تشکیل اجزای اکسیژن دار معیوب و واکنش پذیر (ROS) و تراکم کروموزوم همراه است. مگنتیت پوشش دار به دلیل مکان های اکسایش بالقوه

دارای نسبت ابعادی کمتری نسبت به نمونه هشت ساعت بود. در این پژوهش جذب پروتئین‌های جینی گاوی (FBS) در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰ درصد بر سطح نانوذره‌ها بررسی شد. در ابتدا کرومای نرم با ۳ مرتبه افزودن PBS و سپس سانتریفیوژ (۶۰۰۰ rpm) از سطح نانوذره‌ها جدا شدند. در ادامه نانوذره‌ها توسط مقدار مشخصی PBS رقیق شدند. ۱۰ میکرولیتر از این نمونه توسط سرنگ هاملتون در ژل تزریق شد. بر طبق آزمایش‌های اولیه برای جداسازی خوب پروتئین‌ها و خارج نشدن آن‌ها از ژل ۱۲۰ دقیقه (ولتاژ ۲۰۰ ولت) زمان لازم است. در تمامی ژل‌های نشان داده شده اولین نوار مربوط به نشانگر پروتئینی است که وزن مولکولی هر پروتئین در کنارش نوشته شده است. باندهای پروتئینی پس از رنگ آمیزی با نقره بدست آمدند. نوارهای ۱ مربوط به FBS با غلظت ۱۰۰ درصد و نوارهای ۲ مربوط به FBS با غلظت ۱۰ درصد هستند. وزن مولکولی پروتئین‌های جذب شده بر سطح نانوذره‌ها با استفاده از نرم افزار Works Lab تعیین شد. همان‌گونه که از ژل شکل ۱۳ روشن است میزان جذب پروتئین در نمونه‌های ده درصد پروتئین FBS کم‌تر است که مربوط به کم‌تر بودن پروتئین‌های موجود در محیط است. میزان جذب پروتئین ۲۷ KDa در نانوذره‌های کروی بیش‌تر از نانوذره‌های میله‌ای است. همچنین با افزایش نسبت ابعادی نانومیله‌ها میزان جذب پروتئین آن‌ها افزایش می‌یابد. جذب پروتئین ۶۷ KDa در تمامی نمونه‌ها زیاد است که به احتمال زیاد مربوط به آلبومین است. شایان ذکر است که برای تعیین دقیق نوع پروتئین‌های مربوط به هر باند بایستی از اسپکترومتری جرمی استفاده کرد. بیش‌ترین میزان جذب پروتئین ۱۸ KDa مربوط به نانوذره‌های کروی و مجاورسازی با FBS ده درصد است. ژل‌های نشان داده شده در شکل ۱۳ با روش رنگ آمیزی نقره ظاهر شدند. همچنین آزمایش‌هایی برای رنگ‌آمیزی ژل با روش کوماسی بلو انجام شد. در آزمایش‌های اولیه از مقدارهای آزمایش‌های بالا استفاده شد. به جز برای نشانگر پروتئینی باندی مربوط به نمونه‌ها ظاهر نشد. بنابراین مقدار بیشتری نمونه تزریق شد. ولی باز هم باندی دیده نشد. حساسیت روش رنگ آمیزی نقره در حد نانوگرم و حساسیت روش کوماسی بلو در حد میکروگرم است [۱۴]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مقدار پروتئین جذب شده بر سطح نانوذره‌های سنتز شده خیلی کم و کم‌تر از میکروگرم است.

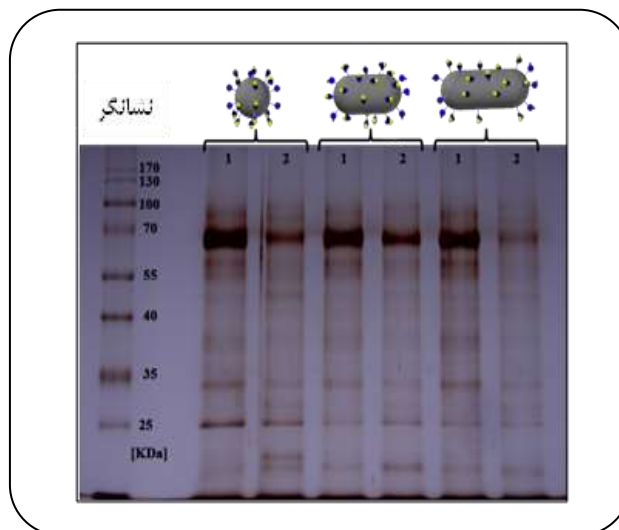
نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانوذره‌های کروی و میله‌ای شکل آهن اکسید



شکل ۱۲- نمودار زیست پذیری بر حسب غلظت نانوذره‌های آهن اکسید برای زمان مجاور سازی (الف) ۴، (ب) ۸ و (ج) ۲۴ ساعت

با روش اصلاح شده هم رسوبی سنتز شدند. با توجه به این که در این سنتز از حلال‌های آلی استفاده نمی‌شود و میزان تولید نانوذره‌ها در هر بار سنتز زیاد است، نسبت به روش‌های میکروامولسیون و آب - گرمایی به لحاظ اقتصادی مناسب‌تر است. میزان زیست‌پذیری این نانوذره‌ها با توجه به این که پیش از مجاورسازی با سلول‌ها در مجاورت محیط کشت سلولی قرار نگرفته‌اند مناسب ارزیابی شد. نتیجه‌های میزان جذب پروتئین‌های جنین گاوی بر سطح نانوذره‌ها با نسبت‌های ابعادی و شکل‌های گوناگون با استفاده از روش الکتروفورز ژلی نشان می‌دهد که الگوی جذب پروتئین‌ها وابسته به شکل است. این مشاهده باعث تفاوت در رفتار و سرنوشت زیستی این ذره‌ها می‌شود که هر کدام از آن‌ها را برای کاربردهای خاص زیستی چشمگیر می‌کند.



شکل ۱۳- الگوی پروتئین کرونای سخت به‌دست آمده از سدیم دو دسیل سولفات ژل الکتروفورز تک بعدی برای نانوذره‌های مغناطیسی کروی و میله ای (نوار اول: نشانگر پروتئینی، نوار ۱: FBS ۱۰۰ درصد، نوار ۲: FBS ۱۰ درصد).

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۴

مراجع

- [1] Buschow K.H.J., "Handbook of Magnetic Material", Elsevier (2006).
- [2] Dennis Chasteen N., Harrison M., Mineralization in Ferritin: an Efficient Means of Iron Storage, *J. Struct. Biol.*, **126** (3): 182–194 (1999).
- [3] Kumar Gupta A., Gupta M., Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, *Biomaterials*, **26** (18): 3995-4021 (2005).
- [4] Mahmoudi M., Lynch I., Ejtehadi M.R., Monopoli M.P., Baldelli Bombelli F. and Laurent S., Protein-Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges, *Chem. Rev.*, **111** (9): 5610–5637 (2011).
- [5] Sharifi Sh., Behzadi Sh., Laurent S., Forrest M. L., Stroevee P. and Mahmoudi M., Toxicity of Nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.*, **41** (6): 2323-2343 (2012).
- [6] Skoog D.A., West D.M., Holler F., "Fundamental of Analytical Chemistry", Saunders College Publishing, (1992).
- [7] Ping Wu., Zhu Y. X., Yang C. and Xie Y., Synthesis of Hematite (α -Fe₂O₃) Nanorods: Diameter-Size and Shape Effects on Their Applications in Magnetism, Lithium Ionbattery, and Gas Sensors, *J. Phys. Chem. B*, **110** (36): 17806–17812 (2006).
- [8] Nandel F. S., Verma R., Singh B., Jaina D.V.S., Mechanism of Hydration of Urea and Guanidium Ion: a Model Study of Denaturation of Proteins, *Pure & Appl. Chem.*, **70** (3): 659-664 (1998).

- [9] Abramova E., Lapides I., Yariv S., [Thermo-XRD Investigation of Monoionic Montmorillonites Mechanochemically Treated with Urea](#), *J. Therm. Anal. Cal.*, **90** (1): 99-106 (2007).
- [10] Sun C., Sze R., Zhang M., [Folic Acid-PEG Conjugated Superparamagnetic Nanoparticles for Targeted Cellular Uptake and Detection by MRI](#), *J. Biomed. Mater. Res.*, **78** (3): 550-557 (2006).
- [11] Giri J., Pradhan P., Somania V., Chelawata H., Chhatre Sh., Banerjee R., Bahadur D., [Synthesis and Characterizations of Water-Based Ferrofluids of Substituted Ferrites \[Fe_{1-x}B_xFe₂O₄, B=Mn, Co \(x=0-1\)\] for Biomedical Applications](#), *J. Magn. Magn.Matter.*, **320** (5): 724-730 (2008).
- [12] Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J., [In Vitro Toxicity of Nanoparticles in BRL 3A Rat Liver Cells](#), *Toxicol In Vitro*, **19** (7): 975-983 (2005).
- [13] Sadeghiani N., Barbosa L.S., Silva L.P., Azevedo R.B., Morais P.C., Lacava Z.G., [Gnototoxicity and Inflammatory Investigation in Mice Treated with Magnetite Nanoparticles Surface Coated with Polyaspartic Acid](#), *J. Magn. Magn.Mater.*, **989**: 466-468 (2005).
- [14] Rabilloud T., [Mechanisms of Protein Silver Staining in Polyacrylamide Gels](#), *Electrophoresis*, **11** (10): 785-794 (1990).